

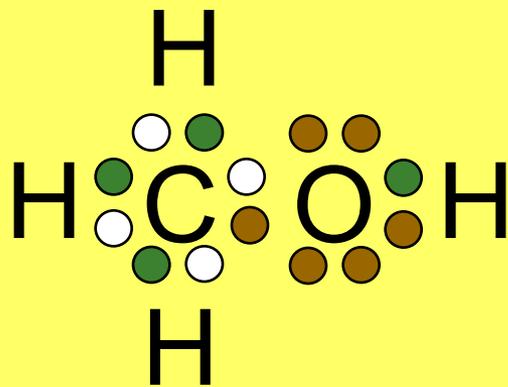
Свободные радикалы. Образование и метаболизм

Ю.А. Владимир

**Медико-биологический факультет РГМУ
Факультет Фундаментальной Медицины МГУ**

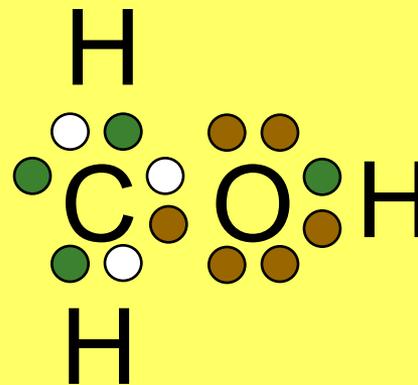
Что такое свободный радикал ?

Свободный радикал - это молекулярная частица, у которой на внешней оболочке имеется хотя бы один неспаренный электрон.



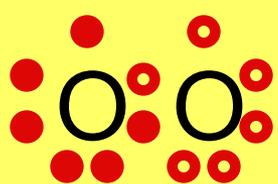
метанол

Радикал может образоваться из молекулы при ее окислении, например при отрыве атома водорода (т.е. электрона и протона)

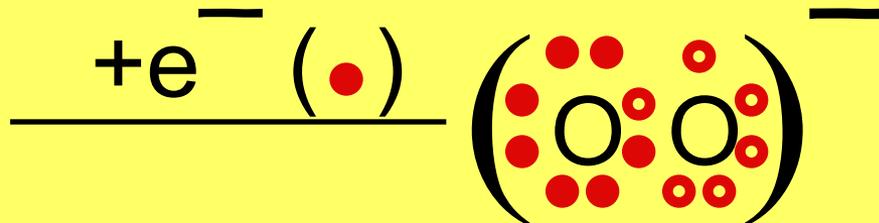


радикал
метанола

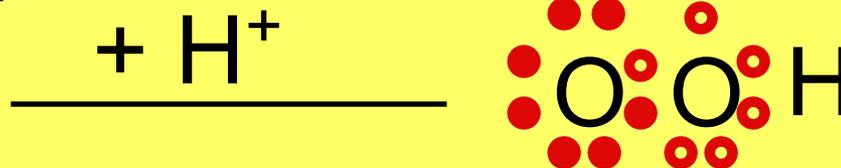
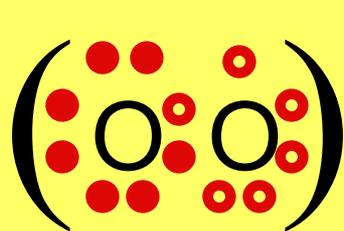
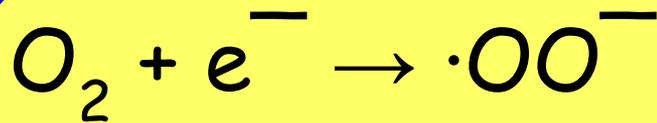
Электронная структура некоторых радикалов



Dioxygen



Dioxide (superoxide)



Гидроперекисный радикал



Гидропероксид водорода

Методы изучения реакций с участием свободных радикалов

Биохимические

Маркеры
Диеновая конъюгация
Ингибиторный анализ

Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)

Прямое обнаружение
радикалов
Метод спиновых ловушек

Хемилюминесценция

Собственная
Активированная



Хемилюминесценция
при цепном
(перекисном)
окислении липидов

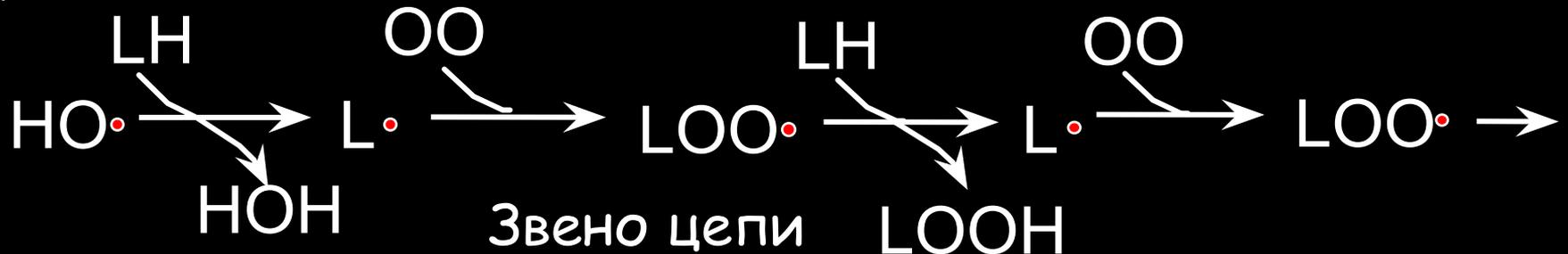
Цепное окисление липидов

Цепному окислению подвергаются жирные кислоты, углеводородные цепи которых содержат двойные связи. Окисление начинается с отрыва атома водорода в метиленовой группе рядом с двойной связью:



Обозначим эту группу как **LH**.

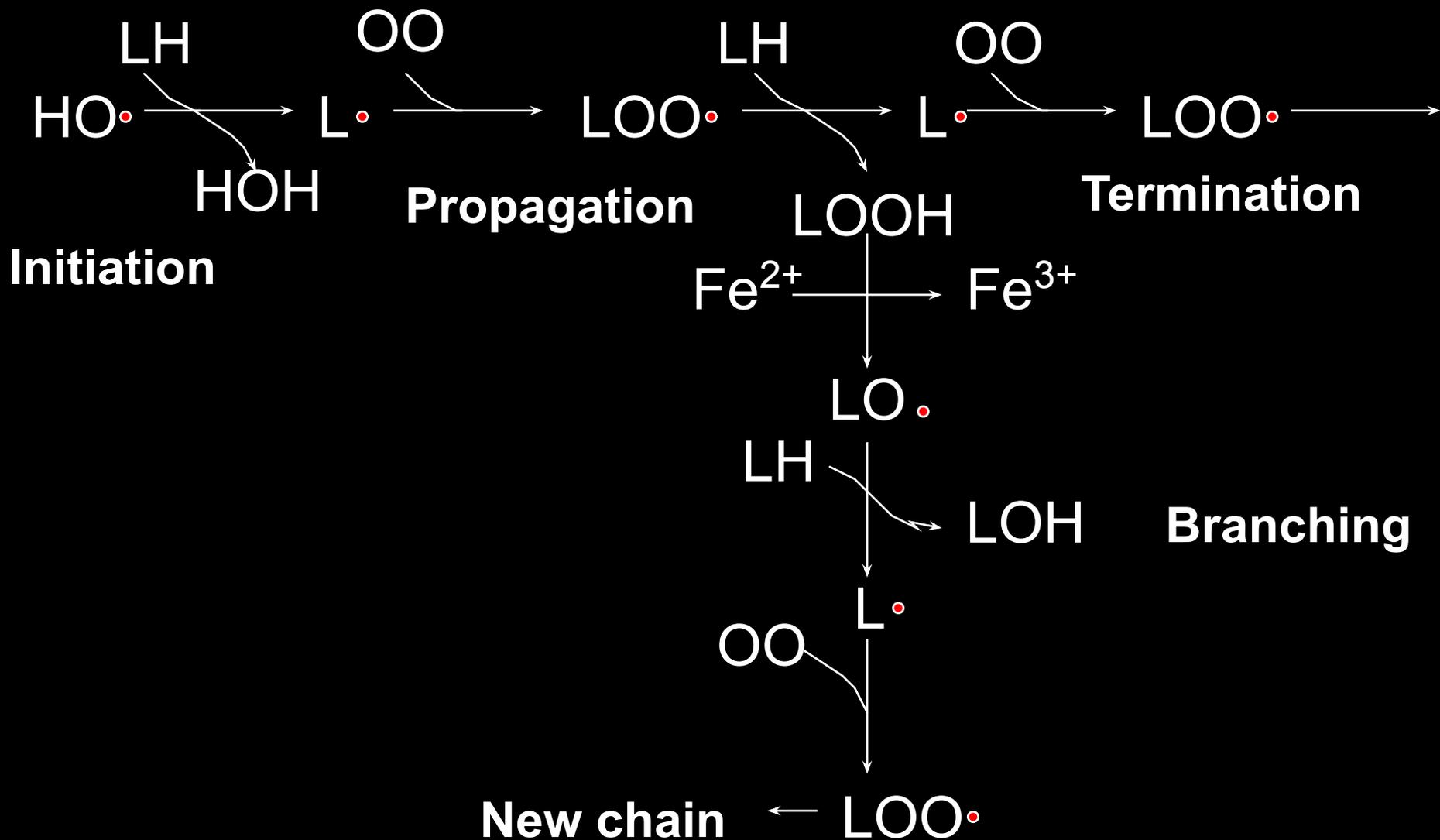
Инициирование
цепи



Продолжение цепи

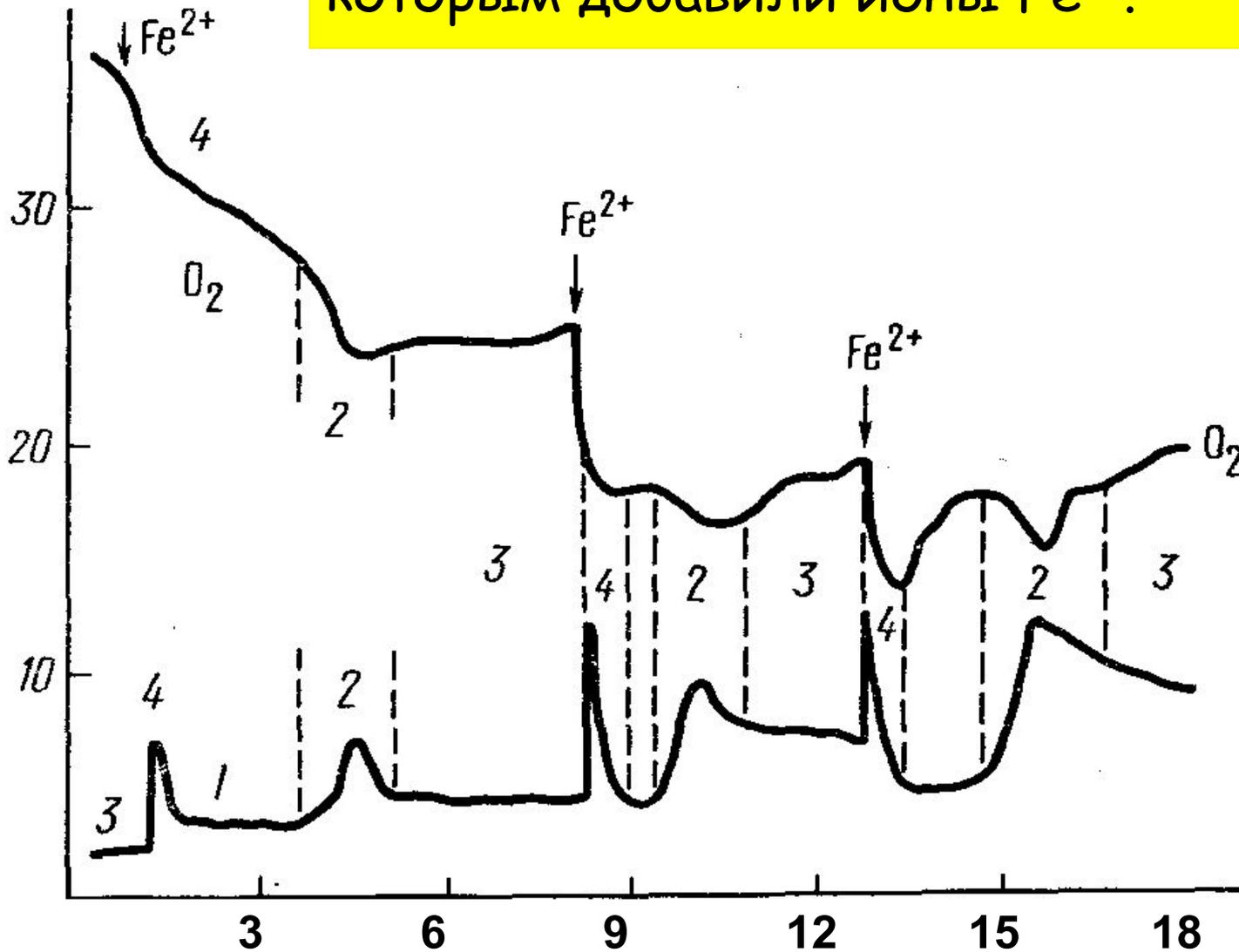


Реакции цепного окисления липидов



Коррелляция между цепным окислением липидов и ХЛ в суспензии митохондрий к которым добавили ионы Fe^{2+} .

ХЛ и $[O_2]$ (отн. ед.)



Время инкубации, мин

Корреляция между образованием продукта пероксидации (МДА) и ХЛ в суспензии митохондрий.

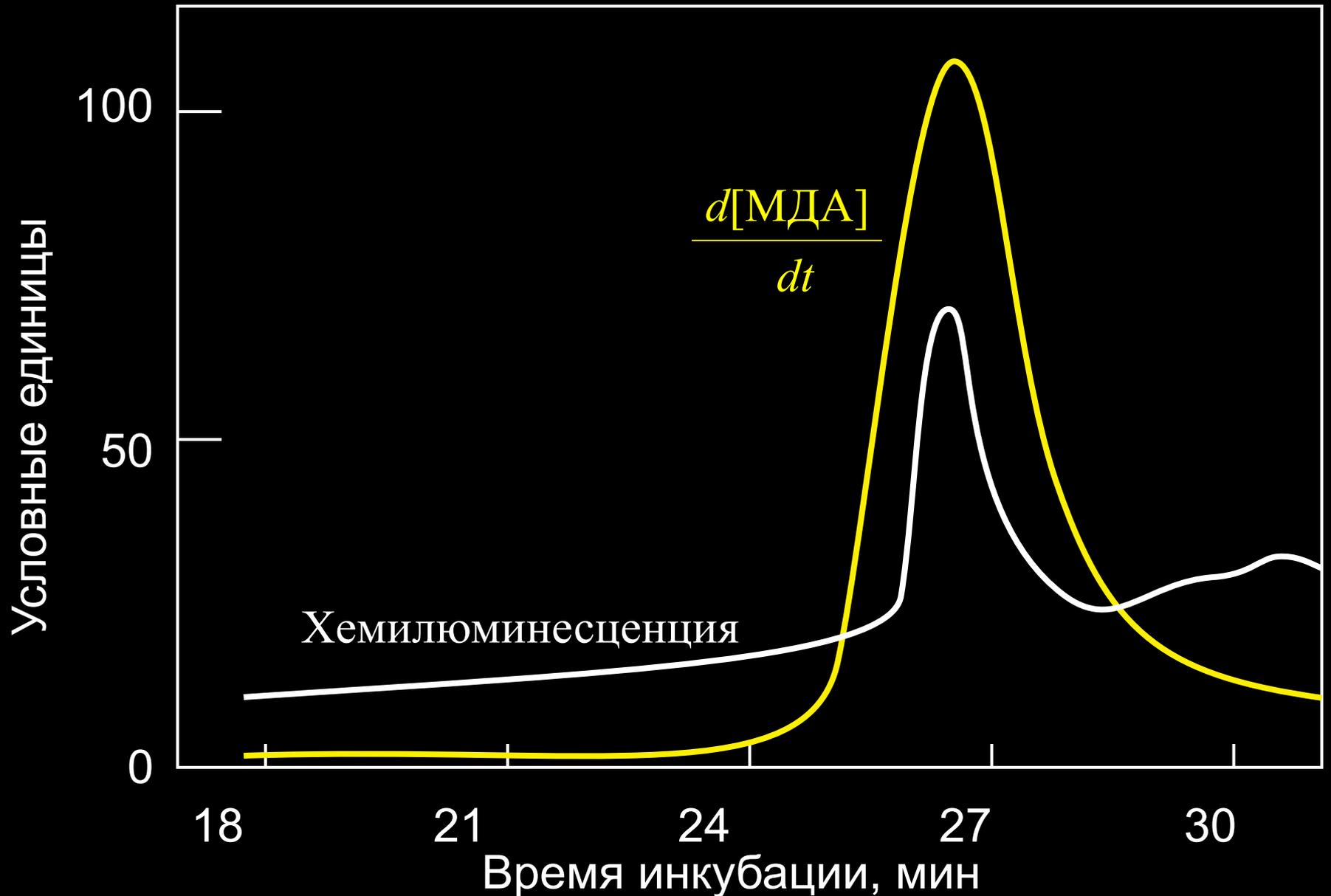
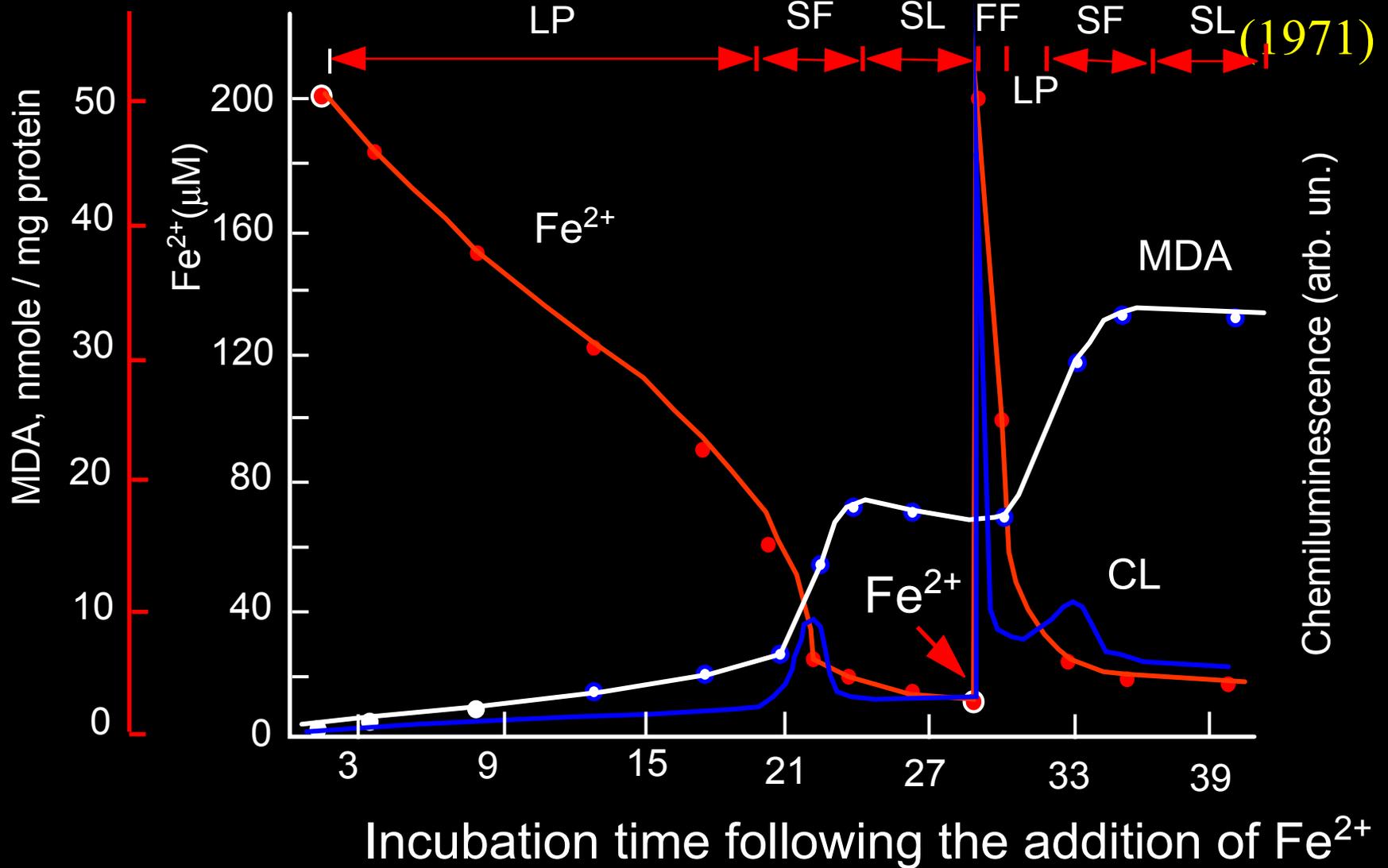


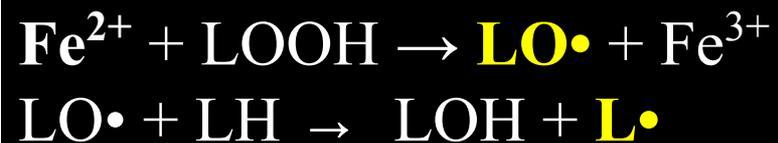
Fig. 8

Stages of lipid peroxidation and chemiluminescence

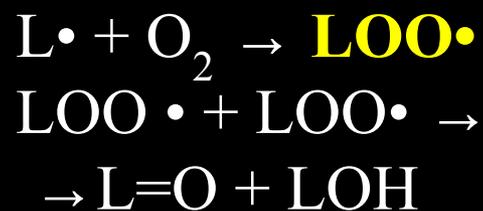


Реакции, ответственные за хемилюминесценцию

В вакууме:

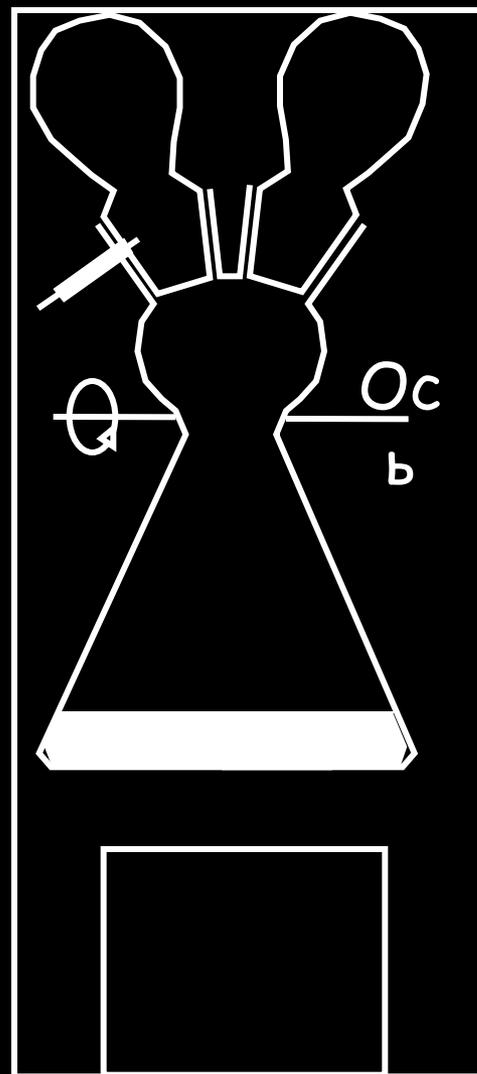
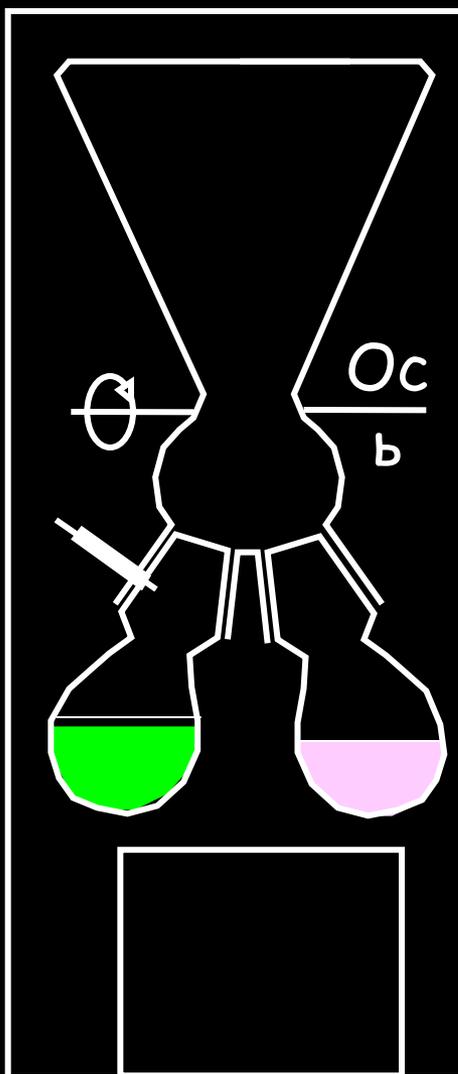


На воздухе:



Fe^{2+}

LOO
 H



Вспышка свечения при взаимодействии Fe^{2+} с окисленными липидами

На воздухе

На воздухе

В вакууме

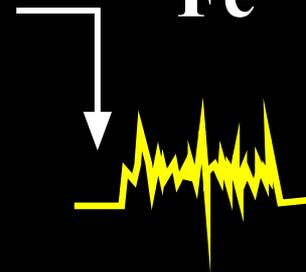
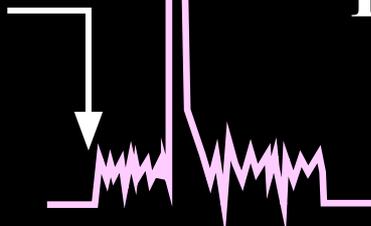
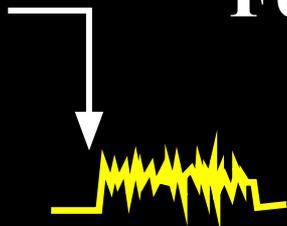
В вакууме

Fe^{2+}

Fe^{2+}

Fe^{2+}

Fe^{2+}



Олеиновая кислота

Митохондрии

Измерение ХЛ - прямой метод определения радикалов $\text{LOO}\cdot$ в биохимических системах



Недостатки ХЛ метода:

1. Свечение **очень слабое**.
2. Свечение **неспецифическое**.

В результате:

Неизвестно, измеряем ли мы нужные нам процессы или же **побочные** реакции.



Хемиллюминесценция при образовании активных форм кислорода

Основоположники

Robert Allan.
Открыл ХЛ
нейтрофилов в
1971 году.

Юрий Владимиров
(1959). Сверхслабое
свечение животных
тканей.

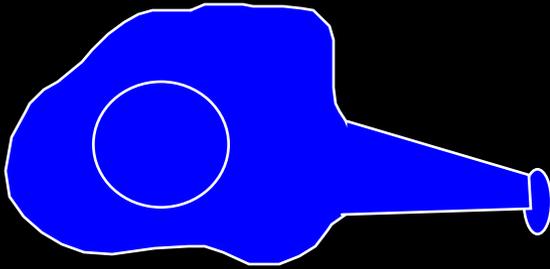
A.U. Khan. Открыл
ХЛ при реакции
гипохлорита с
 H_2O_2 в 1970 г.



Берлин 1997

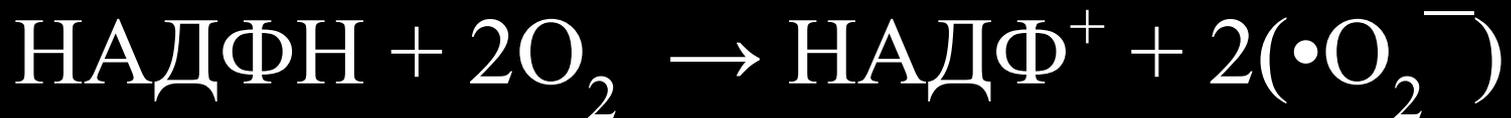
Супероксидный радикал

Основной источник супероксидных радикалов в нашем организме - клетки-фагоциты, к которым относятся **гранулоциты** и **моноциты** крови, и тканевые **макрофаги**.



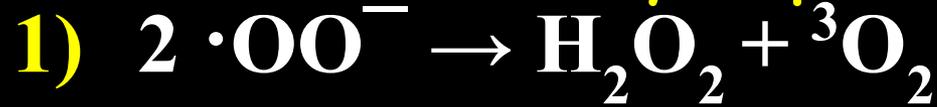
Фагоцит

Встретив чужеродную частицу, например, бактерию, фагоцит прикрепляется к ней и начинает выделять активные формы кислорода, первая из которых - супероксидный радикал.

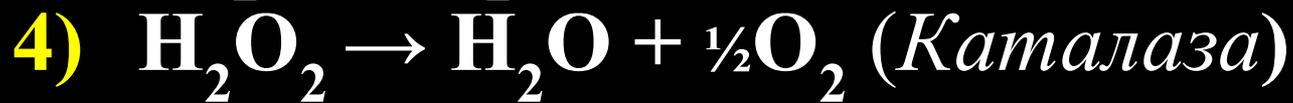
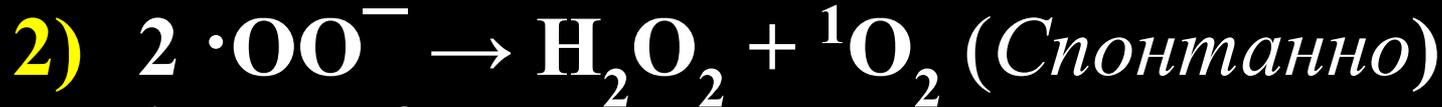


Реакция катализируется ферментным комплексом — **НАДФН оксидазой**, который встроен в цитоплазматическую мембрану.

Метаболизм супероксидного радикала



(Супероксиддисмутаза)



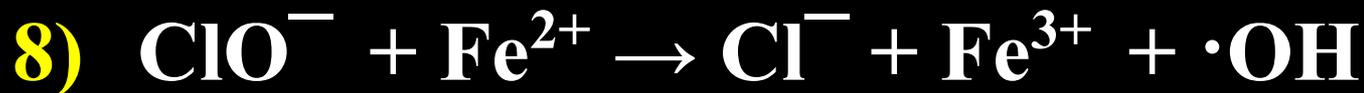
(Миелопероксидаза)



(Реакция Габера-Вейса)



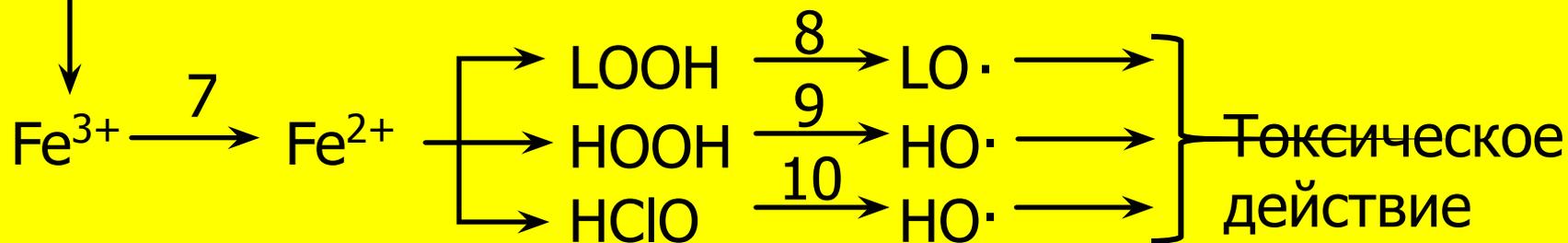
(Реакция Фентона)



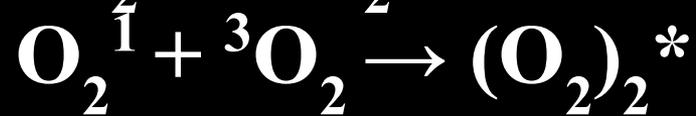
(Реакция Осипова)

Судьба супероксидного радикала и нитроксида

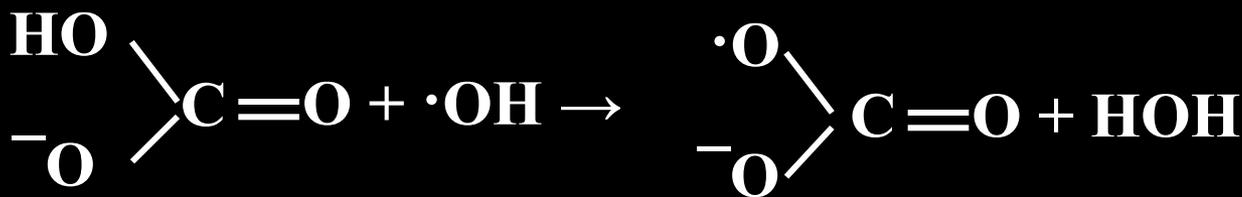
5 OONO (пероксинитрит) \longrightarrow Интоксикация



Хемилюминесценция через стадию образования эксимеров кислорода



Обзор: J. Stauff et al. in *Chemiluminescence and Bioluminescence* (M. Cormier et al., eds), 131-140 Plenum, NY, 1973.



Гипотетическая
схема

Активированная ХЛ

1. Химические активаторы (Sensitizers)

Два типа активаторов ХЛ - CL enhancers

Химические активаторы
– chemiluminogenic probes

Вступают в реакцию с образованием продуктов в электронно-возбужденном состоянии.

Физические активаторы
– sensitizers

Не вступают в химические реакции, но увеличивают квантовый выход испускания фотона.

Активированная ХЛ лейкоцитов

Люминол



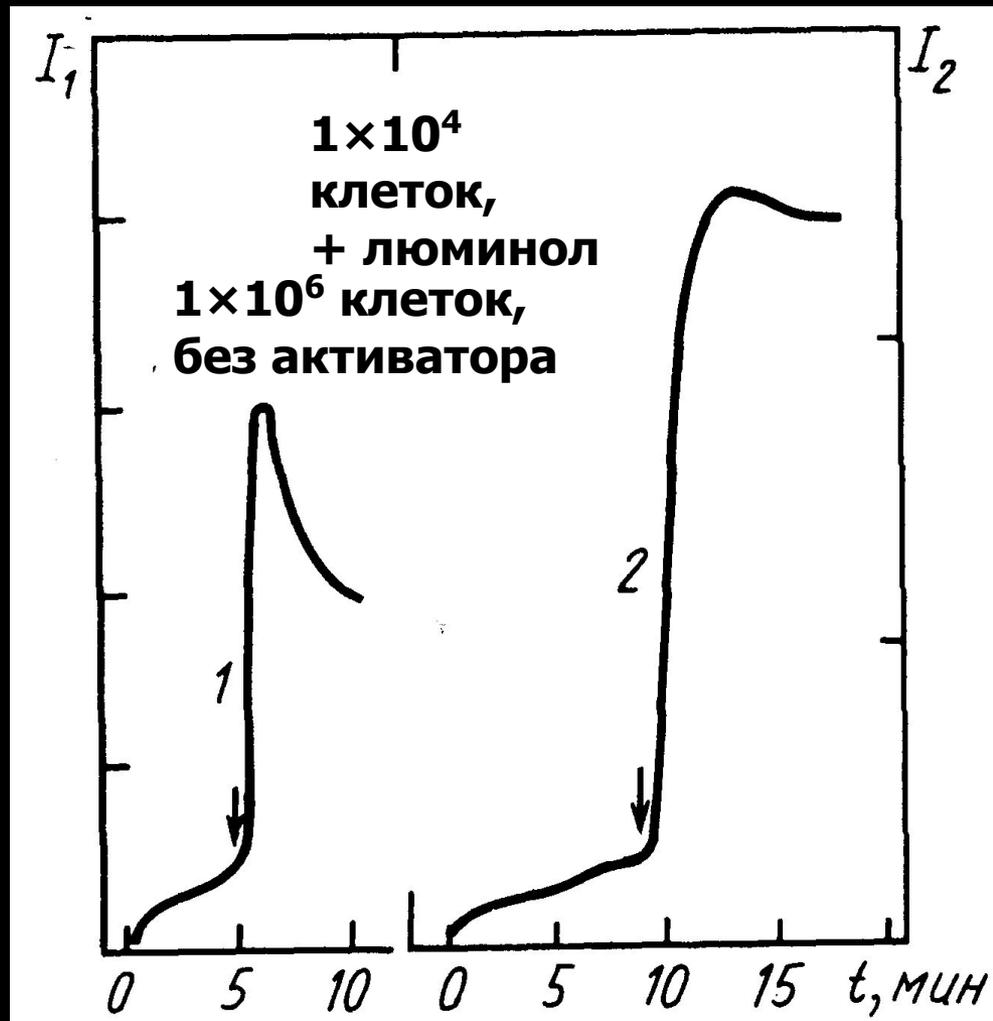
Вспышка ХЛ при добавлении стимула к нейтрофилам.

1- без активатора, 2 – с люминолом.

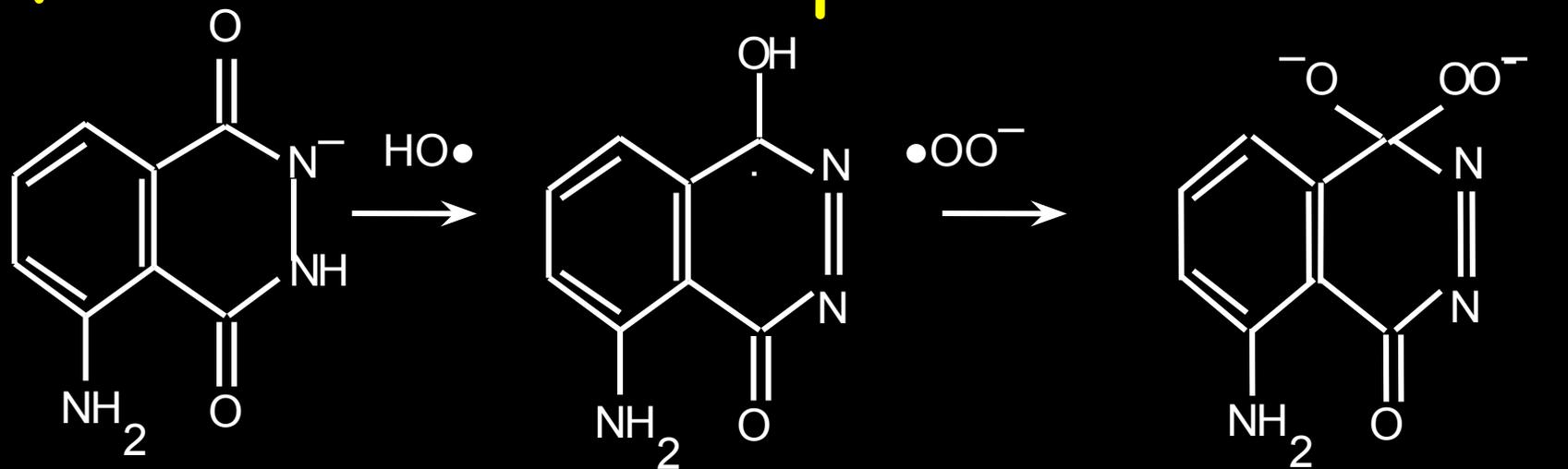
Число клеток: 1 = 1×10^6 , 2 = 1×10^4 .

Чувствительность: 1 = $\times 20$, 2 = $\times 1$.

Yu. A. Vladimirov, S. R. Ribarov, P. G. Bochev, L. C. Benov, and G. I. Klebanov.
Gen. Physiol. Biophys. 9 (1):45-54, 1990.



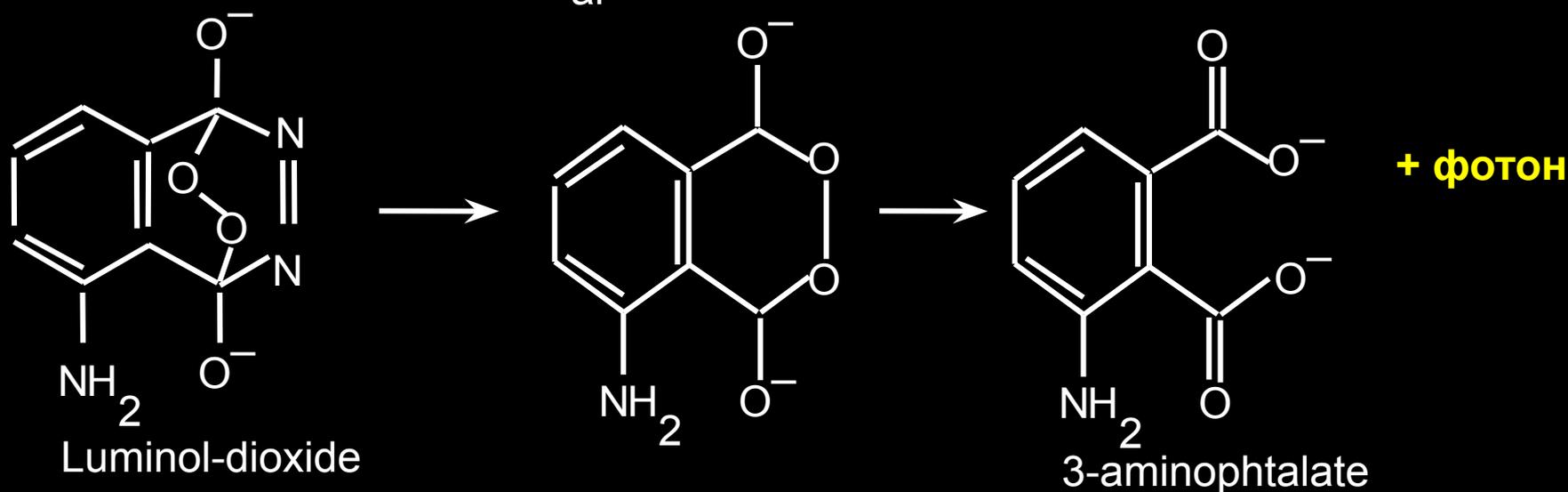
Люминол — реагент на гидроксил-радикал и гипохлорит.



Luminol-anion

Luminol-radical

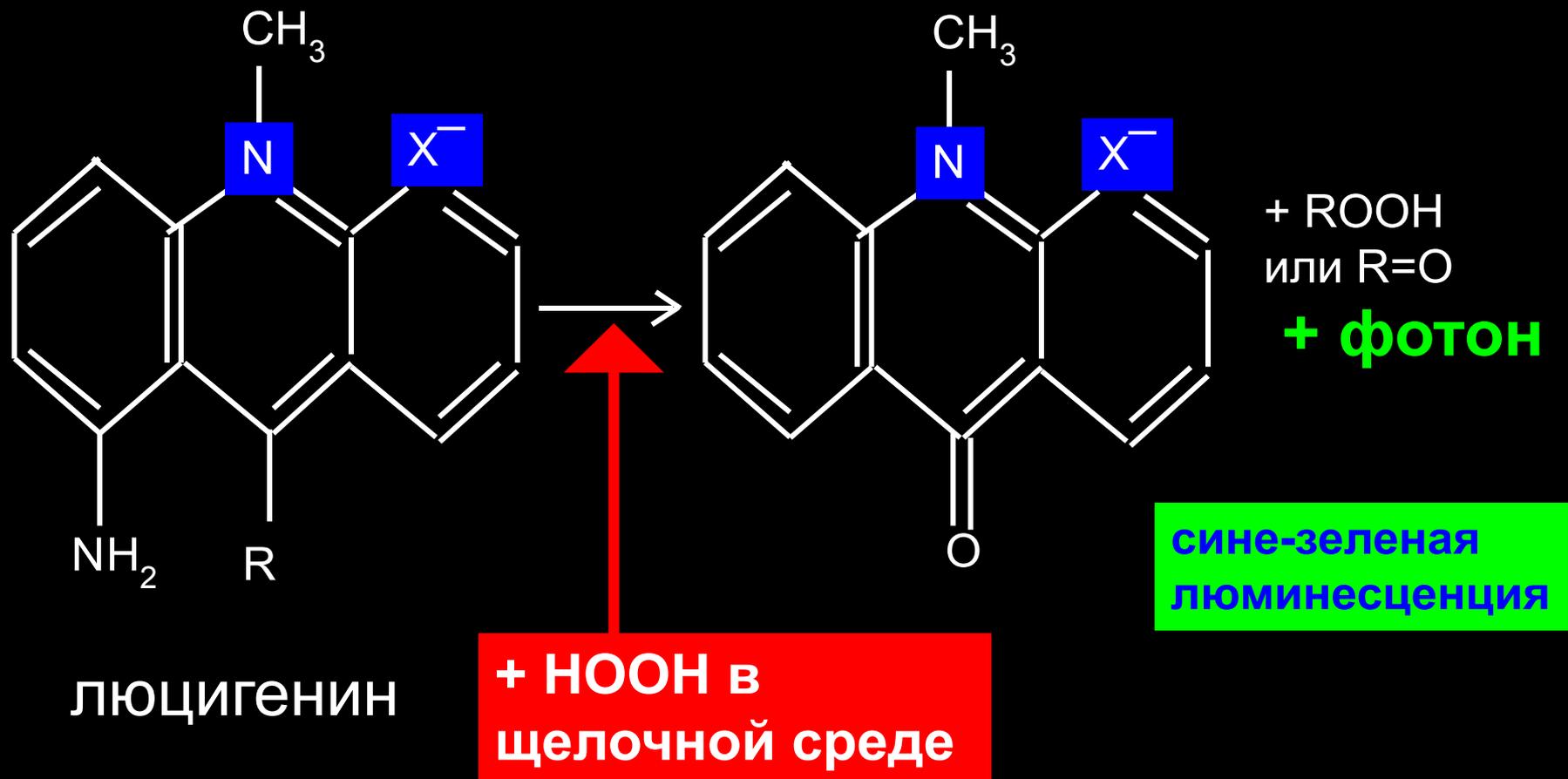
Luminol hydroperoxide



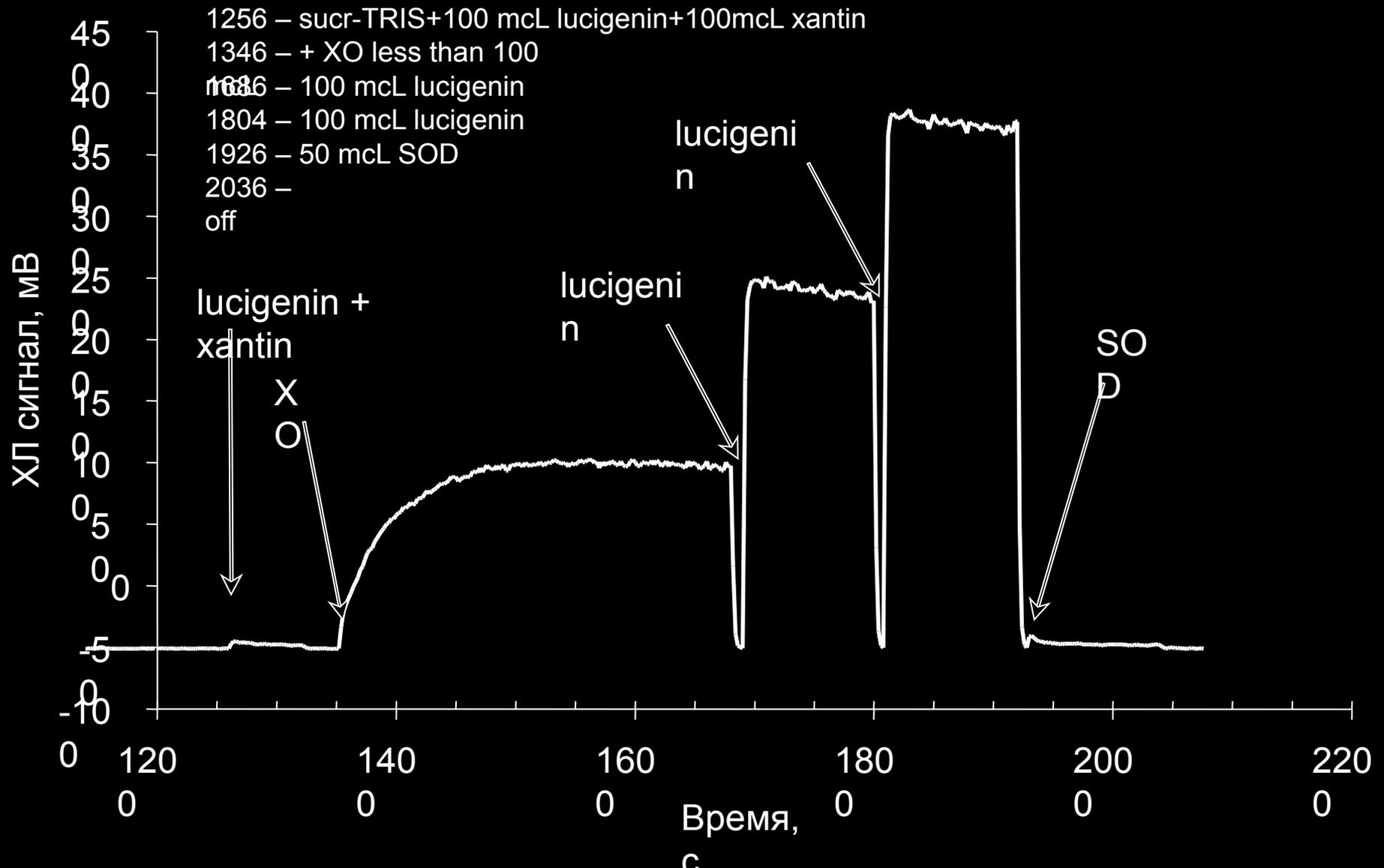
Luminol-dioxide

3-aminophthalate

Люцигенин — реагент на супероксид.



Хемилюминесценция при окислении ксантина



Хемилюминесценция митохондрий

Место образования супероксида в митохондриях

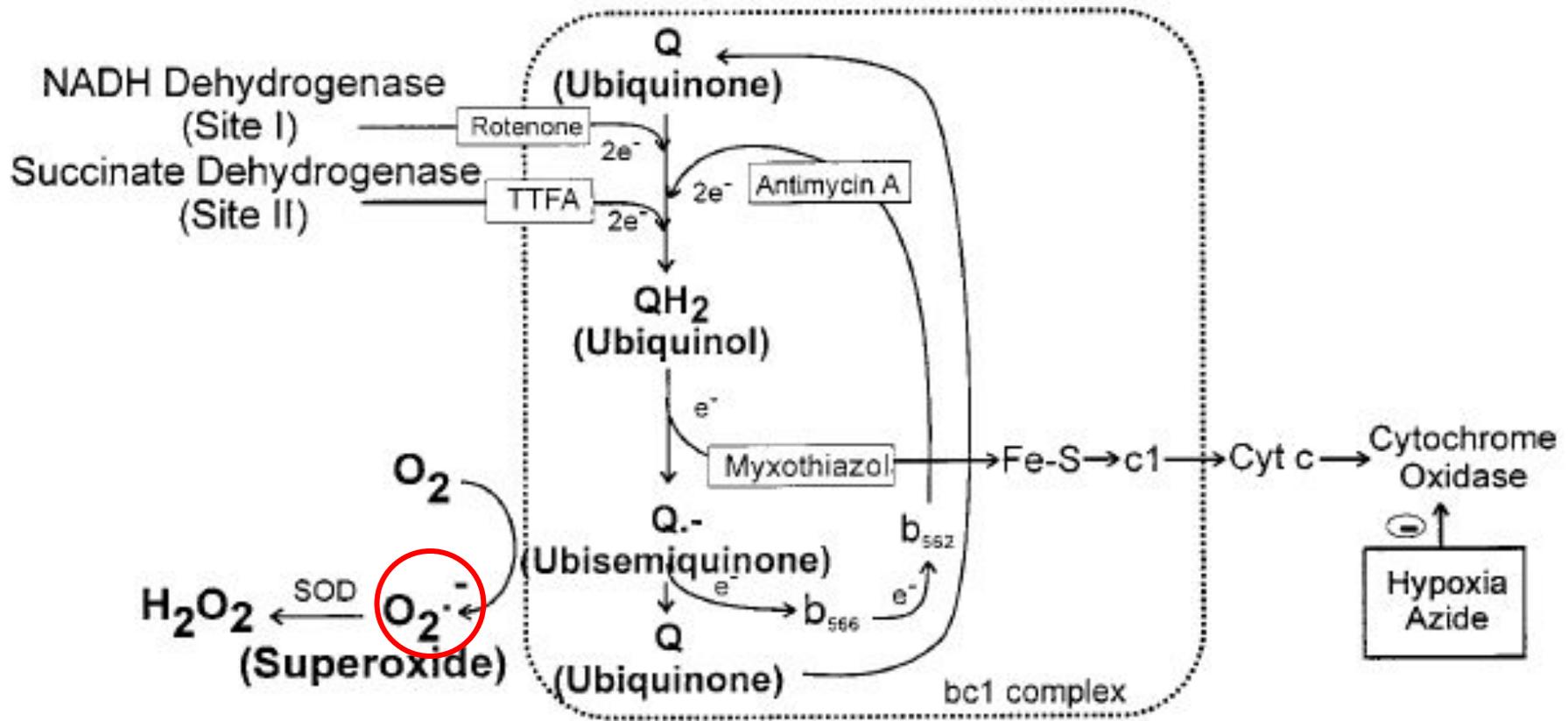


FIG. 8. Scheme illustrating the effects of mitochondrial electron transport inhibition on superoxide generation. Sites of inhibition are indicated with *boxes*.

J. Duranteau‡ N. S. C., A. Kulisz, Z. Shao, and P.T. Schumacker, *Intracellular Signaling by Reactive Oxygen Species during Hypoxia in Cardiomyocytes*, JBC, **273**(19):11619-11624 (1998).

Активированная ХЛ

2. Физические активаторы (Sensitizers)

Активированная ХЛ. Физические активаторы.

Квантовый выход ХЛ ($\eta_{\text{ХЛ}}$):

$$\eta_{\text{ХЛ}} = \frac{\text{Число высвеченных фотонов}}{\text{Число прореагировавших молекул}}$$

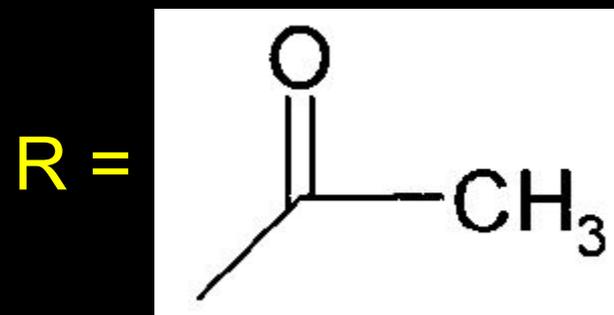
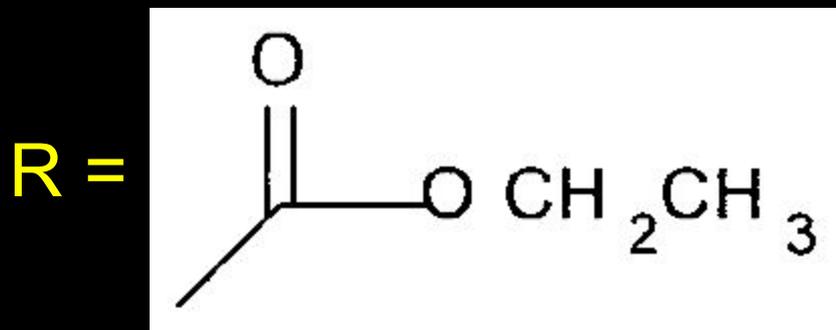
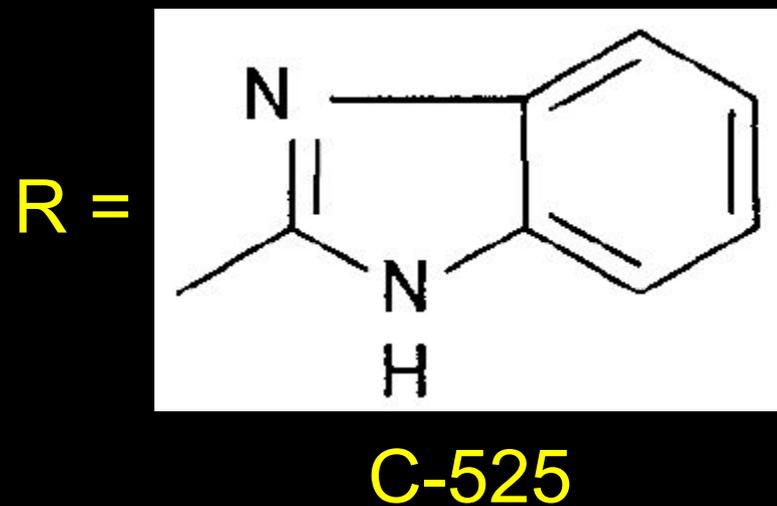
Многие химические реакции сопровождаются очень слабым свечением. Почему оно слабое?

$$\eta_{\text{ХЛ}} = \eta_{\text{ВОЗ}} \cdot \eta_{\text{ЛЮМ}} \approx 10^{-8}$$

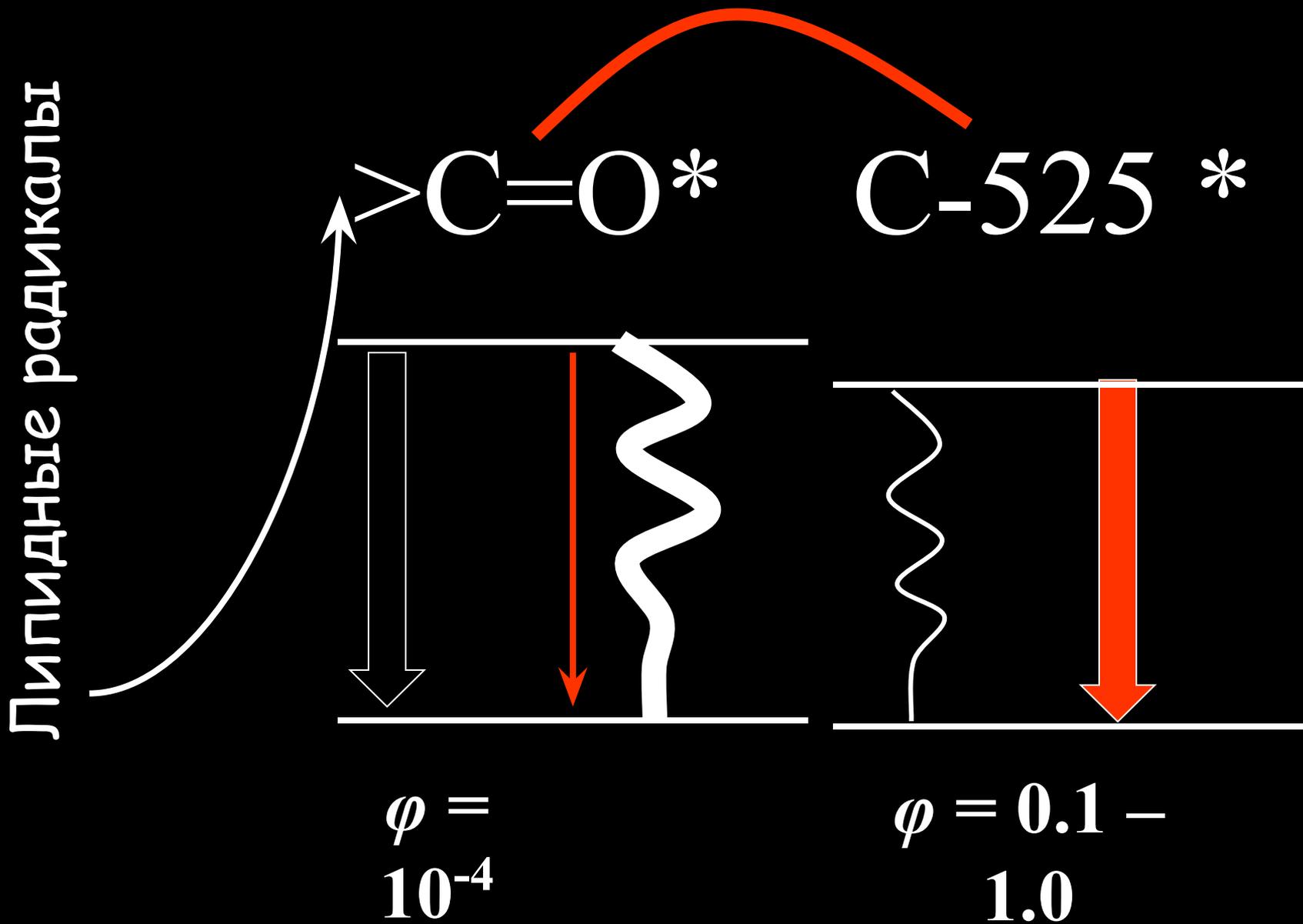
$$\eta_{\text{ВОЗ}} = \frac{\text{Число возбужденных молекул}}{\text{Число прореагировавших молекул}} \approx 10^{-4}$$

$$\eta_{\text{ЛЮМ}} = \frac{\text{Число высвеченных квантов}}{\text{Число возбужденных молекул}} \approx 10^{-4}$$

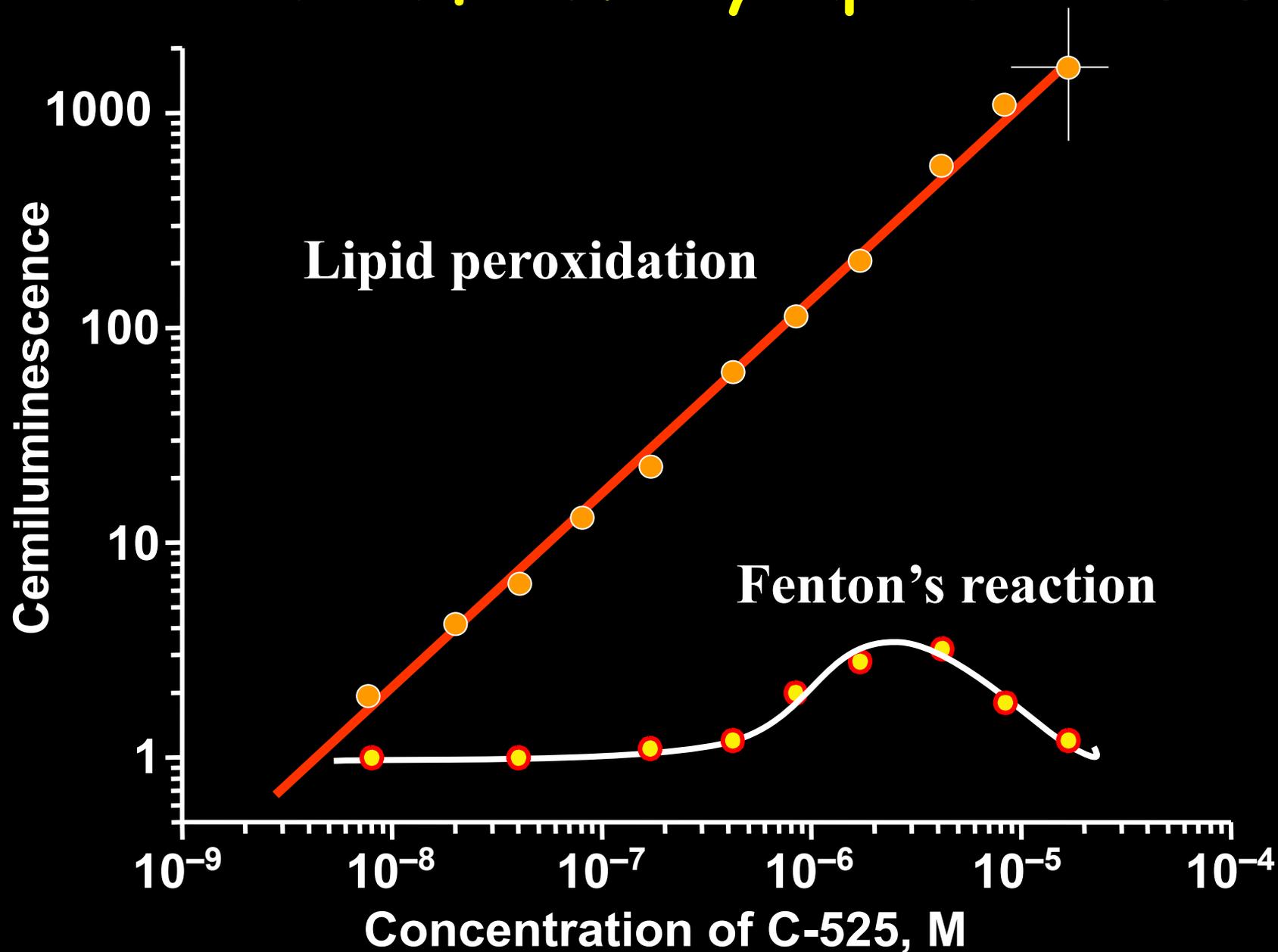
Хинолизин кумарины — физические активаторы



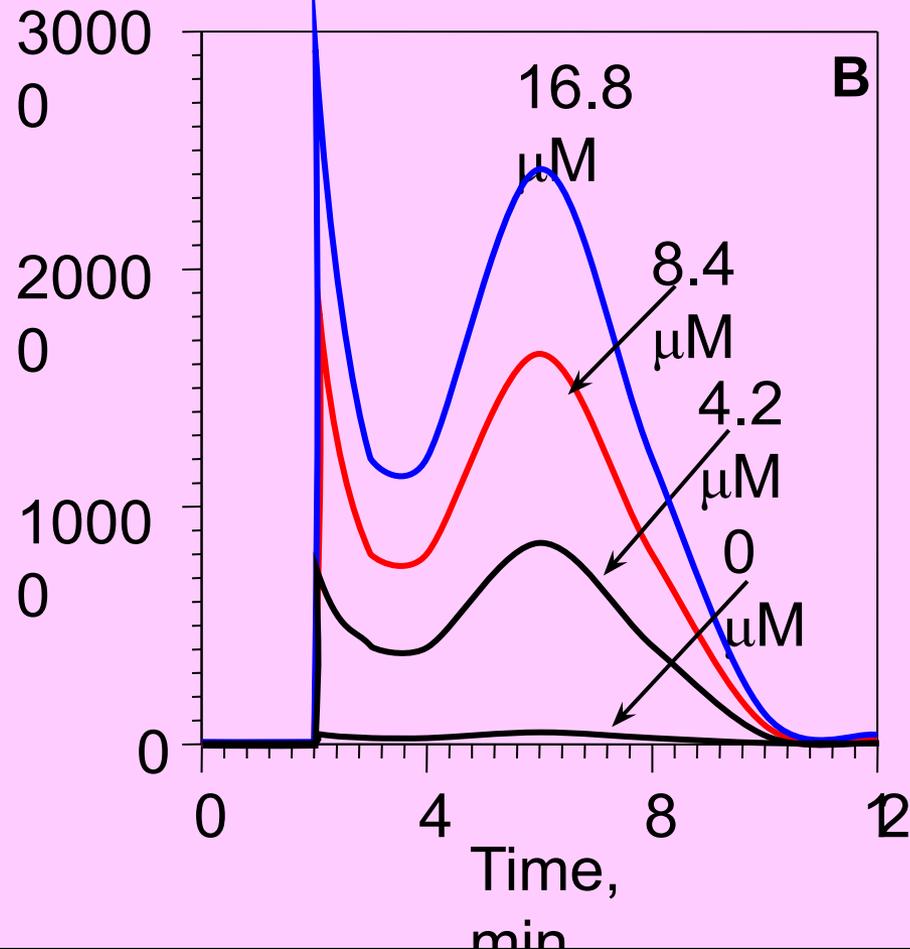
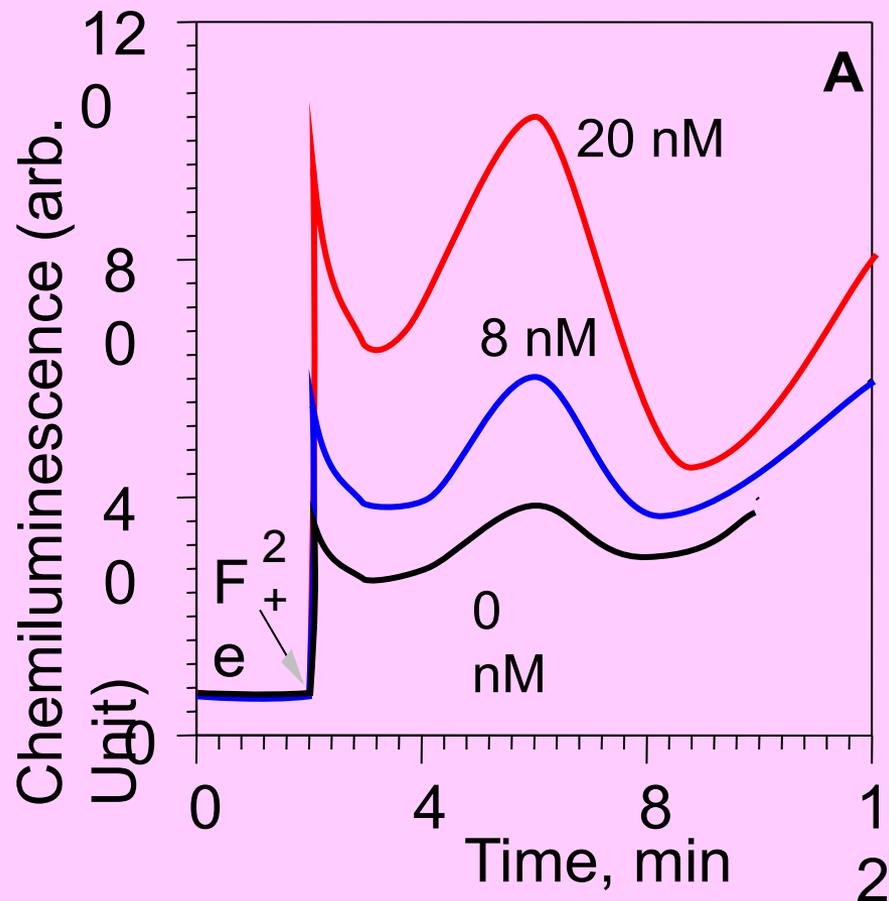
Механизм физической активации ХЛ



Активация ХЛ кумарином C-525



Усиление ХЛ кумарином C-525.



Следующая
презентация